This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problems Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/37, C07K 14/025, 16/08, C12Q 1/68, G01N 33/569, A61K 39/12, 31/70

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/23752

A2

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

4. Juni 1998 (04.06.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: (22) Internationales Anmeldedatum: PCT/DE97/02659

12. November 1997

(12.11.97)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(30) Prioritätsdaten:

196 48 962.8

26. November 1996 (26.11.96) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): KREBSFÖRSCHUNGSZENTRUM DEUTSCHES STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DE VILLIERS-ZUR HAUSEN, Ethel-Michele [DE/DE]; Eichenstrasse 1, D-69483 Waldmichelbach (DE). ZUR HAUSEN, Harald [DE/DE]; Eichenstrasse 1, D-69483 Waldmichelbach (DE). LAVERGNE, Donna [DE/DE]; Schulberg 7, D-67592 Flörsheim-Dalsheim (DE). BENTON, Claire [GB/GB]; The Royal Infirmary, Lauriston P1, Edinburgh EH3 9YW (GB).
- (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).
- (54) Title: PAPILLOMA VIRUSES, AGENTS FOR DETECTING THE SAME AND FOR TREATING DISEASES CAUSED BY SUCH VIRUSES
- (54) Bezeichnung: PAPILLOMVIREN, MITTEL ZU DEREN NACHWEIS SOWIE ZUR THERAPIE VON DURCH SIE VERUR-SACHTEN ERKRANKUNGEN
- (57) Abstract

A DNA is disclosed that codes for a peptide of a papilloma virus main capsid protein or for a papilloma virus genome. Also disclosed are proteins coded by the papilloma virus genome and antibodies against the same, as well as their use in diagnosis, therapy and vaccination.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine DNA, die für ein Peptid eines Papillomvirus-Hauptcapsid-Proteins bzw. ein Papillomvirus-Genom codiert. Desweiteren betrifft die Erfindung durch das Papillomvirus-Genom codierte Proteine und gegen sie gerichtete Antikörper sowie deren Verwendung in Diagnose, Therapie und Vakzinierung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldan	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
RG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
rs.I	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	VG	Uganda
:•Y	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan .	NE	Niger	UZ.	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KР	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		Dillibrow C
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	K2	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 98/23752 PCT/DE97/02659

"Papillomviren, Mittel zu deren Nachweis sowie zur Therapie von durch sie verursachten Erkrankungen"

Die Erfindung betrifft eine DNA, die für ein Peptid eines Papillomvirus-Hauptcapsid-Proteins bzw. ein Papillomvirus-Genom codiert. Desweiteren betrifft die Erfindung durch das Papillomvirus-Genom codierte Proteine und gegen sie gerichtete Antikörper sowie deren Verwendung in Diagnose, Therapie und Vakzinierung.

Es ist bekannt, daß Papillomviren das Epithelgewebe von Mensch und Tier infizieren. Human-Papillomviren (nachstehend mit HP-Viren bezeichnet) finden sich in benignen, z.B. Warzen, Kondylome im Genitalbereich, und malignen, z.B. Karzinome der Haut und der Gebärmutter, epithelialen Neoplasmen (vgl. zur Hausen, H., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1288, (1996), Seiten 55-78). Auch werden HP-Viren für die Entwicklung maligner Tumoren im Oropharyngealbereich in Betracht gezogen (vgl. zur Hausen, H., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 78, (1977), Seiten 1-30).

15

20

25

10

5

Papillomviren weisen ein ikosaedrisches Capsid ohne Hülle auf, in dem ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Molekül von etwa 7900 bp vorliegt. Das Capsid umfaßt ein Hauptcapsid-Protein (L1) und ein Nebencapsid-Protein (L2). Beide Proteine, coexprimiert oder L1 alleine exprimiert, führen in vitro zur Ausbildung von Virus-ähnlichen Partikeln (vgl. Kirnbauer, R. et al., Journal of Virology, (1993), Seiten 6929-6936).

Papillomviren lassen sich nicht in Monolayer-Zellkultur vermehren. Ihre Charakterisierung ist daher äußerst schwierig, wobei bereits der Nachweis von Papillomviren erhebliche Probleme schafft. Dies trifft insbesondere für Papillomviren in Karzinomen der Haut zu.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Papillomviren, insbesondere in Karzinomen der Haut, nach-

10

15

20

gewiesen werden können. Ferner sollte ein Mittel bereitgestellt werden, um gegen diese Papillomviren therapeutisch vorgehen zu können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Bereitstellung der Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine für ein Peptid eines Papillomvirus-Hauptcapsid-Proteins (L1) codierende DNA, wobei das Peptid die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10 oder Fig. 11 oder eine davon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine für ein Peptid eines Papillomvirus-Hauptcapsid-Proteins codierende DNA, wobei die DNA die Basensequenz von Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10 oder Fig. 11 oder eine davon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Basensequenz umfaßt.

- Fig. 1 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL17 bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 11180 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.
- Fig. 2 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL20 bei der DSM unter DSM 11181 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.
- Fig. 3 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL27 bei der DSM unter DSM 11182 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

- 3 -

PCT/DE97/02659

Fig. 4 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL35 bei der DSM unter DSM 11183 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

5

WO 98/23752

Fig. 5 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL40 bei der DSM unter DSM 11184 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

10

Fig. 6 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL78 bei der DSM unter DSM 11185 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

15

Fig. 7 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL82 bei der DSM unter DSM 11186 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

20

Fig. 8 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL83 bei der DSM unter DSM 11187 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

25

Fig. 9 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid DL84 bei der DSM unter DSM 11188 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

30

Fig. 10 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA WO 98/23752 PCT/DE97/02659

- 4 -

wurde als Plasmid DL 100 bei der DSM unter DSM 11189 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

Fig. 11 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz einer für ein Peptid von L1 eines Papillomvirus codierenden DNA. Diese DNA wurde als Plasmid HR22 bei der DSM unter DSM 11190 am 17. Sept. 1996 hinterlegt.

Vorstehende DNA wurde mit der DNA bekannter Papillomviren verglichen. Es wurden Sequenzhomologie-Studien durchgeführt. Eine Homologie, die weniger als 90 % beträgt, weist eine erfindungsgemäße DNA als neues HP-Virus aus. Die erfindungsgemäßen DNAs weisen zu bekannten Papillomviren folgende Sequenzhomologien auf:

15

30

10

5

DNA von Fig. 1: 67 % zu HP-Virus 65

DNA von Fig. 2: 62 % zu HP-Virus 17

DNA von Fig. 3: 78 % zu HP-Virus 65

DNA von Fig. 4:

20 DNA von Fig. 5: 86 % zu HP-Virus 10

DNA von Fig. 6: 86 % zu HP-Virus 10

DNA von Fig. 7: 62 % zu HP-Virus 8

DNA von Fig. 8: 66 % zu HP-Virus 65

DNA von Fig. 9: 64 % zu HP-Virus 65

25 DNA von Fig. 10: 75 % zu HP-Virus 15

DNA von Fig. 11: 81 % zu HP-Virus 22 bzw. 23

Erfindungsgemäß kann vorstehende DNA in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEM-T und pGEX-2T. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEF-BOS, cDM8

und pCEV4, anzugeben sind.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um vorstehende, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109 und XL1-Blue, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, NH-3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, und Hela.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise vorstehende DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß vorstehende DNA in
Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid codierenden DNA
inseriert werden kann, so daß vorstehende DNA in Form eines Fusionsproteins
exprimiert werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Papillomvirus-Genom, das vorstehende DNA umfaßt. Der Ausdruck "Papillomvirus-Genom" umfaßt auch ein unvollständiges Genom, d.h. Fragmente eines Papillomvirus-Genoms, die vorstehende DNA umfassen. Dies kann z.B. eine für L1 codierende DNA oder ein Teil davon sein.

20

5

Zur Bereitstellung vorstehenden Papillomvirus-Genoms kann ein übliches Verfahren verwendet werden. Günstig ist ein Verfahren, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:

- (a) Isolierung der Gesamt-DNA aus einer Biopsie epithelialen Neoplasmas,
 - (b) Hybridisierung der Gesamt-DNA von (a) mit vorstehender DNA, wodurch ein in der Gesamt-DNA von (a) enthaltenes Papillomvirus-Genom nachgewiesen wird, und

30

25

(c) Klonierung der das Papillomvirus-Genom enthaltenden Gesamt-DNA von (a) in einem Vektor, und gegebenenfalls Subklonierung des erhaltenen Klons, wobei sämtliche Verfahrensschritte üblicher DNA-Rekombinationstechnik entstammen.

Hinsichtlich der Isolierung, Hybridisierung und Klonierung von Zell-DNA wird ergänzend auf Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) verwiesen.

Der Ausdruck "epitheliales Neoplasma" umfaßt jegliche Neoplasmen des Epithelgewebes bei Mensch und Tier. Beispiele solcher Neoplasmen sind Warzen, Kondylome im Genitalbereich und Karzinome der Haut. Letztere werden vorliegend bevorzugt verwendet, um vorstehendes Papillomvirus-Genom zu isolieren.

Der Ausdruck "Vektor" umfaßt jegliche zur Klonierung von chromosomaler bzw. extrachromosomaler DNA geeignete Vektoren. Beispiele solcher Vektoren sind Cosmide, wie pWE15 und Super Cos1, und Phagen, wie λ-Phagen, z.B. λZAP Expressvector, λZAPII Vector und λgt10 Vektor. Vorliegend werden λ-Phagen bevorzugt verwendet. Vorstehende Vektoren sind bekannt und bei der Firma Stratagene erhältlich.

20

25

15

5

10

Erfindungsgemäße Papillomvirus-Genome können integriert in chromosomaler DNA oder extrachromosomal vorliegen. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, dies abzuklären. Auch weiß er um Verfahren, die zur Klonierung der Papillomvirus-Genome optimalen Restriktionsenzyme herauszufinden. Er wird sich an Genomen bekannter Papillomviren orientieren. Insbesondere wird der Fachmann die vorstehend genannten HP-Viren entsprechend beachten.

30

Beispielhaft wird die Bereitstellung eines mit DL17-G bezeichneten Papillomvirus-Genoms beschrieben. Hierzu wird die Gesamt-DNA aus einer Biopsie eines plattenepithelialen Karzinoms isoliert, mit BamHl gespalten und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarosegel wird danach einem Blotting-Verfahren unterzogen, wodurch die DNA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wird. Diese wird in ein Hybridisierungsverfahren eingesetzt, in dem die DNA von Fig. 1, ggfs. in Kombination mit einer DNA von HP-Virus 65 als markierte Probe verwendet wird. Es wird eine Hybridisierung mit der in der Gesamt-DNA vorliegenden Papillomvirus-DNA erhalten.

5

10

15

Im weiteren wird vorstehende mit BamHI gespaltene Gesamt-DNA in einem A-Phagen kloniert. Die entsprechenden Klone, d.h. die die Papillomvirus-DNA enthaltenden Klone, werden durch Hybridisierung mit der DNA von Fig. 1, ggfs. in Kombination mit einer DNA des HP-Virus 65 identifiziert. Das Insert dieser Klone wird dann einer weiteren Klonierung in einem Plasmid-Vektor unterzogen, wodurch ein Klon erhalten wird, der das Papillomvirus-Genom DL17-G enthält. Das Genom wird durch Sequenzierung bestätigt.

In analoger Weise werden weitere Papillomvirus-Genome bereitgestellt. Sie werden entsprechend der zu ihrer Bereitstellung verwendeten DNAs bezeichnet, mit: DL20-G, DL27-G, DL35-G, DL40-G, DL78-G, DL82-G, DL83-G, DL84-G, DL100-G bzw. HR22-G.

20

25

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein, das durch vorstehendes Papillomvirus-Genom codiert wird. Ein solches Protein ist z.B. ein Hauptcapsid-Protein (L1) oder ein Nebencapsidprotein (L2). Die Herstellung eines vorstehenden Proteins erfolgt in üblicher Weise. Beispielhaft wird die Herstellung von L1 bzw. L2 des Papillomvirus-Genoms DL17-G beschrieben. Hierzu wird das zu der DNA von Fig. 1 verwandte HP-Virus 65 herangezogen. Von diesem ist die vollständige Sequenz und die Lage einzelner für Proteine codierender DNA-Bereiche bekannt. Durch parallele Restriktionsspaltungen beider Genome und anschließender Hybridisierung mit verschiedenen, die L1 bzw. L2 codierende DNA betreffenden Fragmenten werden diese DNAs auf dem Papillomvirus-Genom DL17-G identifiziert. Sie werden durch Sequenzierung bestätigt. Die für L1 codierende DNA wird mit DL17-G-L1-DNA und die für L2 codierende DNA mit DL17-G-L2-DNA bezeichnet.

Im weiteren wird die für L1 bzw. L2 codierende DNA in einen Expressionsvektor inseriert. Beispiele eines solchen für E. coli, Hefe und tierische Zellen sind vorstehend genannt. Insbesondere wird für die Expression in E. coli auf den Vektor pGEX-2T verwiesen (vgl. Kirnbauer, R. et al., supra). Nach Insertion der DL17-G-L1- bzw. DL17-G-L2-DNA wird pGEX-2T-DL17-G-L1 bzw. pGEX-2T-DL17-G-L2 erhalten. Diese Expressionsvektoren exprimieren nach Transformation von E. coli ein Glutathion S-Transferase-L1- bzw. Glutathion S-Transferase-L2-Fusionsprotein. Die Reinigung dieser Proteine erfolgt in üblicher Weise.

Für eine weitere Expression vorstehender L1 bzw. L2 codierender DNA wird das Bacculovirus- bzw. Vacciniavirus-System genannt. Hierfür verwendbare Expressionsvektoren sind z.B. pEV mod. und pSynwtVI für das Bacculovirus-System (vgl. Kirnbauer, R. et al., supra). Für das Vacciniavirus-System sind insbesondere Vektoren mit dem Vacciniavirus "early" (p7.5k)- bzw. "late"(Psynth, p11K)-Promotor zu nennen (vgl. Hagensee, M., E. et al., Journal of Virology (1993), Seiten 315-322). Vorliegend wird das Bacculovirus-System bevorzugt. Nach Insertion vorstehender L1 bzw. L2 codierender DNA in pEV mod. wird pEVmod.-DL17-G-L1 bzw. pEVmod.-DL17-G-L2 erhalten.

Der erstere Expressionsvektor alleine bzw. beide Expressionsvektoren zusammen führen nach Infektion von SF-9 Insektenzellen zur Ausbildung von Virus-ähnlichen Partikeln. Im ersteren Fall umfaßt ein solches Partikel ein L1-Protein, während es im letzteren Fall neben einem L1- auch ein L2-Protein enthält.

25 Ein Virus-ähnliches Partikel letzteren Falls wird auch erhalten, indem die vorstehenden DL17-G-L1- und DL17-G-L2-DNAs gemeinsam in den Expressionsvektor pSynwtVI inseriert werden und das erhaltene pSynwtVI DL17-G-L1/L2 zur Infektion von SF-9 Insektenzellen verwendet wird. Die Reinigung vorstehender Virus-ähnlicher Partikel erfolgt in üblicher Weise. Sie stellen auch einen Gegenstand der Erfindung dar.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein

10

15

20

25

30

bzw. Virus-ähnliches Partikel gerichteter Antikörper. Die Herstellung eines solchen erfolgt in üblicher Weise. Beispielhaft wird es für die Herstellung eines Antikörpers beschrieben, der gegen ein L1 von DL17-G umfassendes Virus-ähnliches Partikel gerichtet ist. Hierzu wird das Virus-ähnliche Partikel BALB/c-Mäusen subcutan injiziert. Diese Injektion wird im Abstand von jeweils 3 Wochen wiederholt. Etwa 2 Wochen nach der letzten Injektion wird das den Antikörper enthaltende Serum isoliert und in üblicher Weise getestet.

In bevorzugter Ausführungsform ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper.
Zu seiner Herstellung werden nach vorstehender vierten Injektion den Mäusen
Milzzellen entnommen und diese in üblicher Weise mit Myelomzellen fusioniert.
Die weitere Klonierung erfolgt ebenso nach bekannten Verfahren.

Mit der vorliegenden Erfindung wird es ermöglicht, Papillomviren, insbesondere in Karzinomen der Haut, nachzuweisen. Hierzu kann die erfindungsgemäße DNA als solche oder von einer weiteren DNA umfaßt eingesetzt werden. Letztere kann auch ein Papillomvirus-Gom oder ein Teil davon sein.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht ferner die Bereitstellung von bisher nicht gekannten Papillomviren. Diese finden sich insbesondere in Karzinomen der Haut. Desweiteren liefert die Erfindung Proteine und Virus-ähnliche Partikel, die auf diese Papillomviren zurückgehen. Darüberhinaus werden Antikörper bereitgestellt, die gegen diese Proteine bzw. Partikel gerichtet sind.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es also, diagnostische und therapeutische Maßnahmen bei Papillomvirus-Erkrankungen zu ergreifen. Darüberhinaus liefert sie die Möglichkeit, eine Vakzine gegen Papillomvirus-Infektionen aufzubauen. Die vorliegende Erfindung stellt somit einen Durchbruch auf dem Gebiet der Papillomvirus-Forschung dar.

Die Erfindung wird durch die Beispiele erläutert.

10

15

20

25

30

Beispiel 1: Identifizierung des Papillomvirus-Genoms DL17-G

Aus der Biopsie eines plattenepithelialen Karzinoms einer immunsupprimierten Person wird die Gesamt-DNA isoliert. 10µg dieser DNA werden mit dem Restriktionsenzyn: BamHI gespalte , und in einem 0,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Gleichzeitig werden auch 10µg vorstehender DNA aufgetrennt, die nicht gespalten worden ist. Das Agarosegel wird einem Blotting-Verfahren unterzogen, wodurch die DNA aus dem Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wird. Diese wird in ein Hybridisierungsverfahren eingesetzt, in dem die vorstehende DNA von Fig. 1 in Kombination mit HP-Virus-65 DNA als p³²-markierte Probe verwendet wird. Es wird eine Hybridisierung mit der geblotteten DNA erhalten.

Vorstehende Verfahren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der DNA-Rekombinationstechnik bekannt. Ergänzend wird auf Sambrook et al., supra verwiesen.

Beispiel 2: Klonierung des Papillomvirus-Genoms DL17-G

Die aus Beispiel 1 erhaltene Biopsie-DNA wird mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten. Die erhaltenen Fragmente werden in eine Ligasereaktion eingesetzt, in der ebenfalls der mit BamHI gespaltene und dephosphorylierte Vektor \(\lambda \text{ZAP} \) Express vorliegt. Die hierbei erhaltenen rekombinanten DNA-Moleküle werden in Bakteriophagen verpackt und diese zur Infektion von Bakterien verwendet. Für diese Verfahrensschritte wird der von der Firma Stratagene angebotene ZAP Express Vektor Kit verwendet. Die erhaltenen Phagenplaques werden dann einem Hybridisierungsverfahren unterzogen, in dem die in Beispiel 1 verwendete p³²-markierte DNA von Fig. 1 in Kombination mit p³²-markierter HP-Virus-65-

PCT/DE97/02659

WO 98/23752

DNA verwendet wird. Es wird eine Hybridisierung mit entsprechenden Phagenplaques erhalten. Aus diesen werden die BamHI-Fragmente von DL17-G isoliert und zusammen mit einem BamHI-gespaltenen, dephosphorylierten Plasmid-Vektor, pBluescript, in eine weitere Ligasereaktion eingesetzt. Die erhaltenen rekombinanten DNA-Moleküle werden zur Transformation von Bakterien, E. coli XL1-Blue, verwendet. Durch Restriktionsspaltungen bzw. Hybridisierung mit vorstehenden DNA-Proben wird ein das Papillomvirus-Genom DL17-G enthaltender Bakterienklon identifiziert. Das Plasmid dieses Bakterienklons wird mit pBlue-DL17-G bezeichnet.

- 11 -

5

10

20

25

Patentansprüche

- DNA, codierend für ein Peptid eines Papillomvirus-Hauptcapsid-Proteins, wobei das Peptid die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6. Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10 oder Fig. 11 oder eine davon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt, und wobei die DNA durch folgende Verfahrensschritte erhältlich ist:
 - (a) Isolierung der Gesamt-DNA aus einer Biopsie epithelialen Neoplasmas,
 - (b) Hybridisierung der Gesamt-DNA von (a) mit einer DNA von Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10 oder Fig. 11, wodurch ein in der Gesamt-DNA von (a) enthaltenes Papillomvirus-Genom nachgewiesen wird, und
 - (c) Klonierung der das Papillomvirus-Genom enthaltenden Gesamt-DNA von (a) in einem Vektor sowie Sequenzierung des Klons.
 - 2. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Peptid des Papillomvirus-Hauptcapsid-Proteins codierende DNA die Basensequenz von Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6. Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10 oder 11 oder eine davon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Basensequenz umfaßt, und wobei die DNA durch folgende Verfahrensschritte erhältlich ist:
 - (a) Isolierung der Gesamt-DNA aus einer Biopsie epithelialen Neoplasmas,
- 30 (b) Hybridisierung der Gesamt-DNA von (a) mit einer DNA von Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10 oder Fig. 11, wodurch ein in der Gesamt-DNA von (a) enthaltendes

PCT/DE97/02659

15

20

- Papillomvirus-Genom nachgewiesen wird, und
- (c) Klonierung der das Papillomvirus-Genom enthaltenden Gesamt-DNA von (a) in einem Vektor sowie Sequenzierung des Klons.
- 5 3. DNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA ein Papillomvirus-Genom umfaßt.
 - 4. Protein, codiert durch das Papillomvirus-Genom nach Anspruch 3.
- 10 5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Papillomvirus-Hauptcapsid-Protein als Virus-ähnliches Partikel vorliegt.
 - 6. Protein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus-ähnliche Partikel auch ein Papillomvirus-Nebencapsid-Protein enthält.
 - Expressionsvektor, umfassend eine für das Protein nach Anspruch 4 codierende DNA.
 - 8. Transformante, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 7.
 - Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 4, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 8 unter geeigneten Bedingungen.
- 25 10. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach einem der Ansprüche 4-6.
 - 11. Verwendung der DNA nach einem der Ansprüche 1-3 als Reagens zur Diagnose.
- 12. Verwendung des Proteins nach einem der Ansprüche 4-6 als Reagens zur
 30 Diagnose, Therapie und/oder Vakzinierung.

- 13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Diagnose Papillomvirus-Infektionen bzw. -Erkrankungen betrifft.
- 14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Therapie und/oder Vakzinie rung Papillomvirus-Infektionen bzw. -Erkrankungen betrifft.

	DL:	17.	seq	fr	om .	1 t	0 4	16:													
	CT	CGA	GGA'	TGG	GGA.	TAA	GTG		rat:											CAG	60
1	GAG	GCT	CCT	ACC	CCT	TTA	CAC				-									GTC	00
	L	E	D	G	E	М	С	D	I	G	F	G	A	С	N	F	K	Q	L	Q	-
61	AAC	GGA:	rag.	ATC	TGG	TGT	TCC.		AGA'											TTTT +	120
-	TT	CT	ATC'	TAG.	ACC.	ACA	AGG'	TAA'	TCT	ATA	rca:	rc r (CTC	STG	AAC	ATTO	CAT	AGG	ACTA	AAAA	
	K	D	R	s	G	V	P	L	D	I	V	E	S	T	С	K	Y	P	D	F	-
121				-+-			+				+			-+			+			ACAG	180
	AA'	rtt(CTA	CCC.	ATT	CCT.	ATA	CAT.	ACC(GCT(GCT(CGA'	raa:	AAA(GAT.	ACC	GTC'	rgc'	rct	rgtc	
	L	••	M			_			G	_	_	L	F	F	Y	G	R	R	E	Q	-
181				-+-			+	- <i>-</i> -			+			-+-			+			ACCT	240
														_					AAA'	TGGA	
	_	Y			H 		F	_		A	G maa	T	V TCC	G 3 3 3 4	D maa	S	I	P	ים	P TAAA	-
241				-+-			+				+			-+-			+			TTTA	300
	D			ATG.					s s		N N	T.	A	N	N	D	L	P	0	N	_
	_	ĸ	_	_					•	-	-		TGG'	TTC'	TTT	AAC	CAG	TAG	~ TGA	TTCT	
301				-+-		- - -	+				+			-+-			+			+ AAGA	360
	T	L	A	s	н	I	Y	С	Α	I	P	s	G .	s	L	т	s	s	D	s	_

Q L F N R P Y W L Q N A Q G T N N G -

1			CCI														+ ATT			+ TGTT	60
	I	E	D	G	D	М	v	D	I	G	F	G	N	С	N	F	ĸ	A	L	Q	-
6 1																				TTTT	••
οŢ																				+ AAAA	12
	Q	D	K	A	G	T	P	L	E	L	Т	N	E	ĸ	С	ĸ	W	P	D	F	~
21			GAT																	GCAA	10
																				CGTT	10
	L	ĸ	M	E	ĸ	D	Т	Y	G	D	Q	M	F	F	С	G	R	K	E	Q	-
31																				ATCA	24
-																				TAGT	
	M	Y	S	Ŕ	Н	M	L	A	K	A	G	I	D	G	D	Н	I	P	E	S	-
11																				AACC	30
	AA'	TAT	GGT.	AAG	CGG	TTT	CTT	ATT.	ACC	TTT.	ACC	GTA	ACG	AGG	AAT	GTG	AAT	GAA	AGG	TTGG	
	_	-	Н		_	K		•	_	N	_			P		_	Y	-	-	T	-
01			CGG'													GCC	ATA +	TTG	GCT	TCAT	36
	TG'	rtc	GCC.	AAG	GAA'	TCA	GTG	TTC.	ACT.	ATT.	AGT'	TAA	TAA	АТТ	GTC	CGG	TAT	AAC	CGA	AGTA	
	T	s	G	s	L	V	T	S	D	N	Q	L	F	N	R	P	Y	W	L	H	-

Fig. 2

		27.																			
.1				- + -			+				+			-+-			+			GCAG	60
																	K				_
	GA	- TGA	TAA	ATC	CAG	TGC	ACC	ATT	AGA	TGT	AGT	TGG	TAC	TTT	GTG	TAA	ATG	GCC'	TGA	CTTC	
61																				GAAG	120
	D	D	K	s	s	A	P	L	D	v	V	G	T	L	С	K	W	P	D	F	-
121		AAA 	GAT																	ACAG	180
	AA	ТТТ	СТА	CTC																TGTC	
	L		М	S								•					R			Q	-
181				-+-			+				+			-+-			+			GCCT	240
																	CAA L			CGGA P	_
																				- TCTT	
241																				agaa	300
	F	E	v	K	s	D	Y	I	I	A	A	Q	s	N	Q	E	Q	N	Ŋ	Ŀ	-
301																				GCTT	360
502					AAT	AAA	ACC	TTG	AGG	ATC	GCC	AAG	AGA	ACA	TAG	TTC	ACT	TAG	AGT	CGAA	
	G	P	Н	I	Y	F	G	Т	P	S	G	_	_	V		,			Q	L	-
361				-+-			+				+			-+-				41	.0		
																	GTA				

A Q G T N N G

	DL	35.	seq	[II	om	1 t	:0 3	83:													
1				-+-			+				+			-+-			+			ACAG + TGTC	60
	I	E	D	G	E	M	V	E	Т	G	F	G	A	L	D	F	A	Α	L	Q	-
61				-+-			+				+			-+-			+			CTAT + GATA	120
	S	N	K	s	D	V	P	L	D	I	С	T	N	I	С	K	Y	P	D	Y	-
121																				GCAG	180
	GA	CTT	TTA	CCG	ACG	ACT	GGG	GAT	ACC	GCT	AAG	ATA	CAA	GAA	AAG	GGA	CGC	GTC	CCT	CGTC	
	L	K	M	A	A	D	P	Y	G	D	S	M	F	F	S	L	R	R	E	Q	-
181				- + -			+				+			-+-			+			GGAG	240
															ACT	GCG	GGA	GGG	CCT	CCTC	
		F					_			-	_	_		_	D		L	_		E	-
241				-+-			+				+			-+-			+			TCCC	300
	GA'	TAT	GCA(GTT'	TTC.		ATG	GCA	CGT	CTG	GGG	TCC.	ATC.	AAT.	ACA	AAT	GTG	GAG	GTG	AGGG	
	_	Y	-		-	S	-	V	-	_	_	G	_	-	•	Y	T	S	Т	P	-
301				-+-			+				+			-+-			+				360- 🚐
													-							CTCC	
	_	G			V 	_		E	-	Q	r	F.	N	K	Р	Y	W	Ļ	R	R	-
361		TCA.		-+			+			3											
	CG	AGT'	ΓCCI	ATG	$\mathbf{TT}P$	\mathbf{TTA}	GCC	GCA													

WO 98/23752 PCT/DE97/02659

DL40.seq from 1 to 386: ATGGAAGACGGAGATATGGTAGACACTGGCTATGGTGCTATGGACTTCACTGCATTACAG 1 -----+ 60 ${\tt TACCTTCTGCCTCTATACCATCTGTGACCGATACCACGATACCTGAAGTGACGTAATGTC}$ MEDGDMVDTGYGAMDFTALQ -TTAAATAAGTCTGACGTGCCTATAGATATTTGCCAGTCCACTTGTAAATACCCTGATTAT 61 ------ 120 AATTTATTCAGACTGCACGGATATCTATAAACGGTCAGGTGAACATTTATGGGACTAATA LNKSDVPIDICQSTCKYPDY -121 -----+ 180 AACCCGTACCGTCGTCTCGGAATACCGCTGTCGTACAAAAAAATAAACGCGTCTCTCGTT L G M A A E P Y G D S M F F Y L R R E Q 181 ------ 240 L F A R H F F N R A S A V G D T I P D T TTAATATTGAAGTCGGCCAGTGGTGACCAAAACGTTGGTAGTGCTGTATAGCCCCACT 241 -----+ 300 AATTATAACTTCAGCCGGTCACCACTGGTTTTGCAACCATCACGACACATATCGGGGTGA LILKSASGDQNVGSAVYSPT -CCCAGTGGGTCCATGGTAACATCTGAGGCTCAATTATTAATAAGCCATATTGGCTGAAG 301 ------ 360-GGGTCACCCAGGTACCATTGTAGACTCCGAGTTAATAAATTATTCGGTATAACCGACTTC PSGSMVTSEAQLFNKPYWLK -CGGGCTCAAGGACATAACAATGGTGT 361 ----- 386 GCCCGAGTTCCTGTATTGTTACCACA

RAQGHNNG

6/11

	שע	10.	seç	I LI	om	1 0	.0 3	86:													
1		GGA													GGA	CTI	TAC			ACAG	5 0
	GA	CCT	CCI	'ACG	CCI	TTA	.CCA	TCI	GTG	ACC	TAT	ACC	ACG	GTA	.CCI	'GAA	ATG			TGTC	00
	L	E	D	A	Ē	M	V	D	T	G	Y	G	A	M	D	F	Т	A	L	Q	-
51																			TGA	TAT	
61		 TTT															•			ATAA	120
	L	N	ĸ	s	D	v	P	I	D	I	С	Q	s	Т	С	K	Y	P	D	Y	_
																				ACAA	
121																				+ TGTT	180
	L	G	M	A	A	E	P	Y	G	D	s	М	F	F	Y	L	R	R	E	Q	-
	CT	GTT'	TGC	CAG	ACA	TTT	$ ext{TTT}$	TAA	TAG	GGC	TAG	TGC	AGT	TGG	GGA	.CAC	CAT	TCC	TGA	- CACT	
181				-+-			+				+			-+-			+			+ GTGA	240
		F				F							v		D	т	I	P	D	T	_
	TT	GAT	ATT(GAA	GGC.	AGC	CAG	TGG	AGG	GCA	AAA	CGT	TGG	TAG	TGC	TGT	TTA	CAG	CCC	CACA	
241				-+-			+	-			+			-+-			+			+ GTGT	300
	Τ.		τ,			A				0		v		s			y	s	P	т	_
	_	-	_			••	_	_	_	-		·		_		•	_	_	-	ACGG	
301				-+-			+				÷			-+-			+			TGCC	360
		s																			
											Q		r	N	K	P	Y	W	L	R	-
361				-+-			+				6										
	GC	CCG	AGT"	rcc,	I'TG	CTT	GT T (GCC'	TCA												

1			 CCT									ACC		-+- GTA	CTT	AAA	GTC	ATA!	LAA!	ACAA + IGTT	60
	I	Ε	D	G	D	M	С	D	I	G	F	G	N	M	N	F	s	I	L	Q	-
61																				TCTT	120
01																				AGAA	
	Q	D	R	s	G	v	P	L	D	I	V	A	s	I	С	K	W	P	D	L	-
121	_		TAA				TGT							CTT						GCAG	180
121	CC						ACA	CAT	ACC	ACT	ACT	TGA	AAT.	GAA.	AAA	ACC	ATT	TGC	CCT	CGTC	
	G	K	M	T	N	D	V	Y	G	D	E	L	F	F	F	G	K	R	E	Q	-
181																				GGTA	240
																				CCAT	
	v	Y	A	R	H	Y	F	Т	R	H	G	v	V	G	E	D	I	P	Q	V	-
241		TGA	GGA	ccc -+-	TAC									AGG					GGC	TACT	300
241		ACT	CCT	GGG	ATG	TTG	ATT	TAT	GGA	.CGC	TCC	TCC	ACT	TCC	ACC	AGT	TTT	AGT	CCG	ATGA	
	N	E	D	P	Т	T	K	Y	L	R	G	G	E	G	G	Q	N	Q	A	T	-
301	GT	TTC.	- ATC	- CTC	- TGT	- ATA	TTT	TGC	AAC	TCC	CAG	TGG	TTC	CTT	GGI	GTC	CAG	TGA	TGC	TCAA	360
301	GT	TTC.	_ ATC		TGT	- ATA 	TTT +	TGC	AAC	TCC	CAG	TGG	TTC	CTT	GGT	GTC	CAG	TGA	TGC	-	360
301	GT CA	TTC.	ATC TAG	CTC -+- GAG	TGT ACA	- ATA 	TTT + AAA	TGC ~ ACG	AAC	TCC	CAG +	TGG	TTC	CTT	GGT CCA	GTC CAG	CAG + GTC	TGA ACT	TGC 	TCAA	360
301	GT CA V	TTC AAG S	ATC TAG	CTC -+- GAG S	TGT ACA V GCC	ATA TAT Y TTA	TTT+ AAA F	TGC ACG A	AAC TTG	TCC AGG	CAG + GTC S	TGG ACC G	TTC AAC S	CTT -+- GAA	GGT CCA V	GTC CAG S	CAG CAG GTC	TGA ACT D	TGC ACG	TCAA + AGTT	360

	CI	'GGA	.GGA	TGO	GCG <i>I</i>	CAI	rgro	STG	· ATG1	'AGG	: A ጥባ	ቦጥርብ	:AGC	יתכר	מממי	שיטים.	ממייי	חממ	ልርጥ	TCAG	
1				-+-			+				+			-+-			+			+ AGTC	60
	L	E	D	G	D	М	С	D	v	G	F	G	A	A	N	F	ĸ	T	L	Q	-
61																				CTTT	120
-																				GAAA	120
	E	D	K	s	G	V	P	M	D	L	L	N	E	Т	С	ĸ	Y	P	D	F	-
121																				ACAA	180
																				TGTT	100
	L	Q	M	s	K	D	K	Y	G	D	S	L	F	F	F	G	R	K	E	Q	-
181																				AACT	240
																				TTGA	
	L	Y	A	R	H	F	Y	V	R	G	G	V	D	G	D	A	L	P	L	T	-
				-+-			+				+			-+-			+			TTAC	300
	TT	GAA.	ATA.	AAT.	ACC	ACG	AGT	CGT	CCT	GTT	TGG	AGT	TTT	GTT	AAA	TCC	TGG	TAT	ATG	AATG	
	N		I				~	_				-						_	_	Y	-
301				-+-			+				+			-+-			+			CTAT	360
																				GATA	
														Q	L	F	N	R	P	Y	-
361			TAG(ATC(-+-			+				+		39	5							
	W	L	s	Q	A	Q	G	т	N	N	G		_								

	DL	84.:	seq	fr	om	1 t	0 4	07:													
																				TTCG	60
1																				AAGC	60
	L	E	D	A	E	M	s	D	I	G	L	G	A	v	N	F	н	Т	F	s	-
<i>c</i> 1	GC																ATG			TTTT	120
61	CG																			AAAA	120
	A	s	R	s	D	A	P	L	Ē	v	I	D	s	I	С	K	W	P	D	F	-
121																				ACAG	180
121																				TGTC	
	v	Q	M	T	K	D	v	Y	G	D	K	I	W	F	Y	G	K	R	E	Q	-
181	CT	TTA'	TGC	CAG.																TGAG	240
	GA	AAT	ACG	GTC'	TGT.	ATA	CAA	ACA	ATT	CCT	ACC	ACA	CCT	GCC	ACT	GTC	ATA	AGG	TTT	ACTC	
					H												-	P	N	E	-
241				-+-			+				+			-+-			+			TGGA	300
																				ACCT	
																	Т				
301				-+-			+				+			-+-			+			TTTA	360
																				AAAT!	
	K		S		_												A	1	·	F	-
361				-+-	TTG		+				+			-+-			- 40	7			
	TT.	ATC:			AAC W		H		TCG A	AG1	G	. т Т	NI NI	N.	G		-				
	TA	1	E.	•	44	-	**	~ .	• •	×	_	-			_						

		DIO		_	1																
:				+				-+			-+-			+						PATCA	60
	T	AAC'	TCC	TGC	CAC	TAT	ACI	AGC	TAT	AAC	CCA	AAC	CGT	TAT	'ATT	TAT	TGT	TCT	GTA	TAGT	60
	I	E	D	G	D	M	I	D	I	G	F	G	N	I	N	N	K	T	L	s	-
61	G:	raaj	ACA	AAT +	CAG.	ATG	TTA	GTT	TAG	ATT	TAG	TAA	ATG	AAA	TAG	CTA	AAT.	ATC	CAGA	TTTT	
	CZ	ATT.	rgt'	TTA	GTC'	TAC.	AAT	CAA	ATC	TAA	ATC	ATT	TAC'	rtt.	ATC	GAT	TTA	TAG	GTCI	'AAAA	120
	V	N	K	s	D	V	S	L	D	L	V	N	E	Ī	A	K	Y	P	D	F	_
121	T T	`AAC	'AA'	rgg	CTA	ATG	ATG	TGT.	ATG	GCG.	ATT	CTT	GCT7	.I.I.I.	TTT	TTG	CCA	GGA	AGA	ACAA	
		(TTC	TT	ACC	GAT'	rac'	TAC.	ACA:	TAC	CGC'	raa:	GAA	GA	\AA	AAA	AAC	GGT	CTC	TCI	TGTT	180
	L	T	M	A	N	D	V	Y	G	D	·s	С	F	F	F	A	R	R	E	Q	-
181	TG	TTA	TGC	TAC	AC	\TTI	ATT:													TACA	
						'AA'	LAAT	AATO	ATC	TCC	TCC	TCC	ACA	CCC	CAC!	TAC	SAT	TGC	ACT	ATGT	240
	С	Y	A	R	H	Y	F	T	R	G	G	A	v	G	D	A	I	P	D	T	_
241	AC.	AAC	TAA	TCA -+-	AGA	TCA	CAA									GAC		CCA	AAG	TCCT	
					TCT	AGT	GTI	PAT	'GA'I	AGA	TCC	TGG	ATT	CTC	ACC	TG	TAC	GGI	TTC.	AGGA	300
	T	T	N	Q	D	H	K	Y	Y	L	A	P	K	s	G	Q	s	Q	s	p	-
301	TT(GGG'	raa	TTC	TAT	TTA 	CTA	TCC	CAC	CGT	TAG	TGG	CTC	CTT	'AG1	TTC	TTC	TGA	TGC.	ACAG	
	AA	מכנ	TTA	AAG.	ATA	AAT	GAT	'AGG	GTG	GCA	ATC	ACC	GAG	GAA	TCA	AA	AAC	ACT	'ACG'	TGTC	360
	L	G	N	s	I	Y	Y	P	T	V	s	G	S	L	v	S	s	D	A	Q	-
361	CTC	TT	CAA	CAG.	ACC	CTT	CTG +			ACG			GGG	GCA	CAA	'TAA	CGG	CAT	41	כ	
	GAC	AA	ŢŢŢ	GTC!	TGG	GAA	GAC	CAA	CTT	TGC.	ACG	TGT	CCC	CGT	GTI	'ATI	GCC	GTA	₩ ±.	.	
	L	F	N	R	P	7	W	т.	v	ъ	7.	^	_	7.7			_				

HR22.seq from 1 to 404: ATACAGGATGGGGACATGTTTGATATAGGTTTTGGTAATATTAACAATAAAACTCTATCT 1 -----+ 60 TATGTCCTACCCCTGTACAAACTATATCCAAAACCATTATAATTGTTATTTTGAGATAGA I Q D G D M F D I G F G N I N N K T L S TATAATAAGTCTGATGTAAGTTTAGACATTGTTAATGAAGTATGCAAATATCCAGATTTT 61 -----+ 120 ATATTATTCAGACTACATTCAAATCTGTAACAATTACTTCATACGTTTATAGGTCTAAAA Y N K S D V S L D I V N E V C K Y P D F TTGACAATGTCTAATGATGTGTATGGAGACGCATGCTTTTACTGTGCCCGAAGAGAGCAA 121 -----+ 180 AACTGTTACAGATTACTACACATACCTCTGCGTACGAAAATGACACGGGCTTCTCTCGTT LTMSNDVYGDACFYCAREQ TGTTATGCTAGACATTATTTTGTTCGGGGAGGTCAGGTTGGAGATGCAATACCTGACGAG 181 ----- 240 ACAATACGATCTGTAATAAAACAAGCCCCTCCAGTCCAACCTCTACGTTATGGACTGCTC C Y A R H Y F V R G G Q V G D A I P D E GCAGTCCAACAAGATCACAAATATTATTTACCTTCTGATACACGGCGCACTTTAGAAAAC 241 ------ 300 CGTCAGGTTGTTCTAGTGTTTATAATAAATGGAAGACTATGTGCCGCGTGAAATCTTTTG A V Q Q D H K Y Y L P S D T R R T L E N TCCACCTATTTTCCCACCGTAAGCGGGTCGTTGGTGACCTCTGATGCCCAACTATTTAAT 301 ------ 360 AGGTGGATAAAAGGGTGGCATTCGCCCAGCAACCACTGGAGACTACGGGTTGATAAATTA STYFPTVSGSLVTSDAQLFN-AGGCCCTTTTGGTTAAAACGTGCACAAGGCCACAATAACGGAAT 361 ----- 404 TCCGGGAAAACCAATTTTGCACGTGTTCCGGTGTTATTGCCTTA

RPFWLKRAQGHNNG -

WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE

INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) (51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/23752

C12N 15/37, 15/17, C07K 14/025, 16/08, C12Q 1/68, G01N 33/569, A61K 39/12, 31/70

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

4. Juni 1998 (04.06.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/02659

A3

(22) Internationales Anmeldedatum:

12. November 1997 (12.11.97) (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 48 962.8

26. November 1996 (26.11.96) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): KREBSFÖRSCHUNGSZENTRUM DEUTSCHES STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DE VILLIERS-ZUR HAUSEN, Ethel-Michele [DE/DE]; Eichenstrasse 1, D-69483 Waldmichelbach (DE). ZUR HAUSEN, Harald [DE/DE]; Eichenstrasse 1, D-69483 Waldmichelbach (DE). LAVERGNE, Donna [DE/DE]; Schulberg 7, D-67592 Flörsheim-Dalsheim (DE). BENTON, Claire [GB/GB]; The Royal Infirmary, Lauriston P1, Edinburgh EH3 9YW (GB).
- (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 16. Juli 1998 (16.07.98)

- (54) Title: PAPILLOMA VIRUSES, AGENTS FOR DETECTING THE SAME AND FOR TREATING DISEASES CAUSED BY SUCH
- (54) Bezeichnung: PAPILLOMVIREN, MITTEL ZU DEREN NACHWEIS SOWIE ZUR THERAPIE VON DURCH SIE VERUR-SACHTEN ERKRANKUNGEN

(57) Abstract

A DNA is disclosed that codes for a peptide of a papilloma virus main capsid protein or for a papilloma virus genome. Also disclosed are proteins coded by the papilloma virus genome and antibodies against the same, as well as their use in diagnosis, therapy and vaccination.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine DNA, die für ein Peptid eines Papillomvirus-Hauptcapsid-Proteins bzw. ein Papillomvirus-Genom codiert. Desweiteren betrifft die Erfindung durch das Papillomvirus-Genom codierte Proteine und gegen sie gerichtete Antikörper sowie deren Verwendung in Diagnose, Therapie und Vakzinierung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

				Leestho	SI	Slowenien
Albanien		•				Slowakei
Armenien					-	Senegal
Österreich	FR			_ •		Swasiland
Australien	GA					Tschad
Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich		**********		
	GE	Georgien		•		Togo
-	GH	Ghana	MG		-	Tadschikistan
	GN	Guinea	MK			Turkmenistan
	GR	Griechenland		Republik Mazedonien		Türkei
		Ungam	ML	Mali		Trinidad und Tobago
		Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
		Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
			MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
			MX	Mexiko		Amerika
			NE	Niger	UZ	Usbekistan
					VN	Vietnam
_					YU	Jugoslawien
						Zimbabwe
Côte d'Ivoire	KP	•				
Kamerun						
China						
Kuba				*		
Tschechische Republik	LÇ	St. Lucia				
Deutschland	Li	Licchtenstein	_			
			CE	Schweden		
Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
	Armenien Osterreich Australien Aserbaidschan Bosnien-Herzegowina Barbados Belgien Burkina Faso Bulgarien Benin Brasilien Belarus Kanada Zentralafrikanische Republik Kongo Schweiz Côte d'Ivoire Kamerun China Kuba Tschechische Republik	Armenien FI Osterreich FR Australien GA Aserbaidschan GB Bosnien-Herzegowina GE Barbados GH Belgien GN Burkina Faso GR Bulgarien HU Benin IE Brasilien IL Belarus IS Kanada IT Zentralafrikanische Republik JP Kongo KE Schweiz KG Côte d'Ivoire KP Kamerun China KR Kuba KZ Tschechische Republik LC Deutschland LI	Armenien Österreich Armenien Österreich Rustralien Aserbaidschan Bosnien-Herzegowina Belgien Burkina Faso Bulgarien Benin Benin Brasilien Brasilien Belaus Kanada IT Italien Zentralafrikanische Republik Kongo Schweiz Cote d'Ivoire Kamerun China Kuba Kuba Kuba Kuba Kuba Kuba Kunada Kuba Kuba Kuba Kuba Kuba Kuba Kuba Kub	Armenien FI Finnland LT Österreich FR Frankreich LU Australien GA Gabun LV Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Barbados GH Ghana MG Belgien GN Guinea MK Burkina Faso GR Griechenland Burkina Faso HU Ungarn ML Benin IE Irland MN Brasilien IL Israel MR Belarus IS Island MW Kanada IT Italien MX Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Kongo KE Kenia NL Schweiz KG Kirgisistan NO COte d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik NZ Kamerun China KR Republik Korea PL Kuba KZ Kasachstan RO Tschechische Republik LC St. Lucia RU Deutschland LI Liechtenstein SD	Albanten Armenien FI Finnland Costerreich FR Frankreich Australien GA Gabun Ascrbaidschan Bosnien-Herzegowina Barbados Belgien GN Guinea Burkina Faso Burkina Faso Burkina Faso Burkina Faso Burkina Faso Burkina Faso Bulgarien HU Ungarn Benin IE Irland Benin Benin IE Irland MN Monaco MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien MK Die hermalige jugoslawische Republik Mazedonien MR Mali Mongolei MR Mali Mongolei MR Mauretanien MR Mauretanien MR Mauretanien MR Mauretanien MR Mauretanien MR Mauretanien MR Malawi M	Albanien Armenien Armenien FI Finnland Armenien Osterreich FR Frankreich Australien Australien Ascrbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco TD Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Republik Moldau TG Barbados GH Ghana MG Madagaskar TJ Belgien GN Guinea MK Die chemalige jugoslawische TM Burkina Faso GR Griechenland MR Republik Mazedonien TR Bulgarien HU Ungarn ML Mali TT Benin IE Irland MN Mongolei UA Brasilien Benin IE Irland MN Mongolei UA Brasilien Belarus IS Island MW Malawi US Belarus Kanada IT Italien MX Mexiko Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Niger UZ Kongo KE Kenia NL Niederlande VN Schweiz KG Kirgisistan NO Norwegen YU Cote d'Ivoire KAP Cote d'Ivoire KAR KR Republik Korea PL Polen China KR Republik Korea PT Portugal RU Russische Föderation Föderation Li clichtenstein SD Sudan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inti ional Application No PCT/DE 97/02659

L. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/37 C12N15/17 C07K14/025 C07K16/08 C120 G01N33/569 A61K39/12 A61K31/70	
20111011 012 HOTIVON IF HOTIVON IA	1/68
according to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
3. FIELDS SEARCHED	
Alnimum documentation searched (classification system totlowed by classification symbols) IPC 6 CO7K C12N C12Q G01N A61K	
ocumentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields sea	arched
electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical search terms used)	
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
alegory * Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
(,P DE VILLIERS E.M. ET AL.: "Prevailing papillomavirus types in non-melanoma	1-3,7
carcinomas of the skin in renal allograft recipients"	
INT. J. CANCER,	
vol. 73, 4 November 1997, pages 356-361, XP002064130	
see page 358, column 1, line 52 - line 58	
′ ,P	5,6,8-14
WO 95 30754 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;SHAMANIN VLADIMIR (DE); VILLIERS ZUR HAUSEN) 16 November 1995	5,6,8-14
see page 1 - page 2	
see page 5 - page 9	
see claims 1-20	1-3,7
	1 0,,,
_/	
X Further documents are listed in the continuation of box C. X Patent family members are listed	in annex.
Special categories of cited documents: "T" later document published after the integer or priority date and not in conflict with considered to be of particular relevance "T" later document published after the integer or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention	the application but
E* earlier document but published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot document which may throw doubts on priority claim(s) or involve an inventive step when the document which may throw doubts on priority claim(s) or	t be considered to
which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 2" document referring to an oral disciosure, use, exhibition or other means "Y" document to particular relevance; the cannot be considered to involve an induction of document is combined with one or mother means.	claimed invention Iventive step when the ore other such docu-
er accument published prior to the international filing date but in the art.	•
later than the priority date claimed "&" document member of the same patent	
later than the priority date claimed "8" document member of the same patent	
later than the priority date claimed "3" document member of the same patent are of the adual completion of the international search Date of mailing of the international search	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ional Application No PCT/DE 97/02659

	Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
ategory :	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
, Р	WO 97 04099 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH; SHAMANIN VLADIMIR (DE); VILLIERS ZUR HAUSEN) 6 February 1997 see page 1 - page 2 see page 5 - page 8 see claims 11-18	1-14		
ł				
]				
ļ				
ļ				
]				
Ì	•			
	·			
İ				
	•			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inte ional Application No PCT/DE 97/02659

Patent document cited in search report		Publication date	Patent tamily member(s)		Publication date
WO 9530754	Α	16-11-1995	DE EP JP	4415743 A 0707652 A 9500285 T	09-11-1995 24-04-1996 14-01-1997
WO 9704099	Α	06-02-1997	DE EP	19526386 C 0839199 A	02-01-1997 06-05-1998

Form PCT/ISA/210 (patent lamity ennex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte onales Aktenzeichen PCT/DE 97/02659

A. KLASSIF IPK 6	Fizierung des anmeldungsgegenstandes C12N15/37 C12N15/17 C07K14/02 G01N33/569 A61K39/12 A61K31/70		C12Q1/68
Nach der Int	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassi	fikation und der IPK	·
B. RECHER	ACHIERTE GEBIETE		
Recherchier IPK 6	rter Mindestprufstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C07K C12N C12Q G01N A61K	•	
Recherchier	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	et diese unter die recherchierd	en Gebiete fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	me der Datenbank und evil. ve	erwendete Suchbegriffe)
C. ALS WE	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden To	eile Betr. Anspruch Nr.
X,P	DE VILLIERS E.M. ET AL.: "Prevai papillomavirus types in non-melan carcinomas of the skin in renal a recipients" INT. J. CANCER, Bd. 73, 4.November 1997,	1-3,7	
	Seiten 356-361, XP002064130 siehe Seite 358, Spalte 1, Zeile Zeile 58		
Y,P	Zerre 36	5,6,8-14	
Υ	WO 95 30754 A (DEUTSCHES KREBSFOR ;SHAMANIN VLADIMIR (DE); VILLIERS HAUSEN) 16.November 1995 siehe Seite 1 - Seite 2 siehe Seite 5 - Seite 9 siehe Ansprüche 1-20	5,6,8-14	
Α			1-3,7
		-/	
	eitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu mehmen	X Siehe Anhang Paten	ntamilie
Besonder "A" Veröfte aber "E" älteres Anme "L" Veröfte soli o ausgi "O" Veröft eine l "P" Veröft dem	re Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist s Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- inen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie eldührt) fentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Aussteltung oder andere Maßnanmen bezieht fentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	oder dem Prioritätsdatum Anmeldung nicht kollidier Erfindung zugrundelteger Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besc kann allein aufgrund dies erfinderischer Tätigkeit "Y" Veröffentlichung von besc kann nicht als auf erfinde werden, wenn die Veröffentlichungen diese diese Verbindung für ein "&" Veröffentlichung, die Mitg	onscher I atigkeit berühend betrachtei entlichung miteiner oder mehreren anderen or Kategorie in Verbindung gebracht wird und en Fachmann naheliegend ist glied derselben Patenttamille ist
	s Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des inter 26/05/1998	nationalen Recherchenberichts
	12.Mai 1998	Bevollmachtigter Bedien	
Name und	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Galli, I	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interionales Aktenzeichen
PCT/DE 97/02659

		97/02659		
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN				
Kategorie [.]	Bezeichnung der Veröffemlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.		
A,P	WO 97 04099 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH; SHAMANIN VLADIMIR (DE); VILLIERS ZUR HAUSEN) 6.Februar 1997 siehe Seite 1 - Seite 2 siehe Seite 5 - Seite 8 siehe Ansprüche 11-18			
	•			
	. '			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Verottentlichursyen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte naies Aktenzeichen
PCT/DE 97/02659

lm Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentlamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9530754	A	16-11-1995	DE EP JP	4415743 A 0707652 A 9500285 T	09-11-1995 24-04-1996 14-01-1997
WO 9704099	Α	06-02-1997	DE EP	19526386 C 0839199 A	02-01-1997 06-05-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THE PART DE TANK (USPTO)